

Efek Antibakteri Kombinasi Ekstrak Metanolik atau Dekokta Daun Sirsak (*Annona muricata* L) dengan Amoksisilin Pada Bakteri *Staphylococcus aureus* atau *Escherichia coli* secara *In Vitro*

Dhimas Kurniawan, Erna Sulistyowati, Reza Hakim*

*Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Resistensi antibiotik merupakan masalah global. Salah satu cara untuk melakukan pencegahan terhadap resistensi antibiotik adalah dengan menggunakan adjuvan antibiotik berupa herbal. Ekstrak daun *A. muricata* L diketahui memiliki efek antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek kombinasi ekstrak daun *A. muricata* L dengan Amoksisilin terhadap *S. aureus* dan *E. coli*

Metode: Ekstraksi menggunakan metode ekstraksi metanolik dan dekoktasi. Uji *zone of inhibition* (ZOI) kombinasi antar amoksisilin dan ekstrak menggunakan metode Kirby Bauer (*disc*) dan interaksinya menggunakan perhitungan *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test* (AZDAST) dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$. Variabel uji terbagi menjadi 5 kelompok, yaitu amoksisilin dosis tinggi (ADT) dan rendah (ADR), ekstrak metanol daun *A. muricata* L dosis tinggi (HDTM), dekokta daun *A. muricata* L dosis tinggi (HDTD), kombinasi dekokta daun *A. muricata* L dengan amoksisilin (DAA) dan kombinasi ekstrak metanol daun *A. muricata* L dengan amoksisilin (EMAA) yang diujikan pada *S. aureus* atau *E. coli*.

Hasil: Pada *S. aureus*, rerata diameter ZOI kombinasi dengan ekstrak metanolik herbal dosis tinggi (HDTM, $14,0 \pm 2,1$ mm) secara signifikan lebih tinggi dibanding ADR tunggal ($8,0 \pm 0,0$ mm, $p = 0,037$). Sedangkan, kombinasinya dengan ekstrak dekokta herbal dosis tinggi (HDTD, $21,0 \pm 0,6$ mm) secara signifikan lebih tinggi dibanding ADR tunggal ($12,0 \pm 0,8$ mm, $p = 0,045$). Kombinasi ekstrak daun *A. muricata* L dan amoksisilin pada *E. coli* tidak didapatkan zona hambat yang signifikan.

Kesimpulan: Kombinasi ekstrak daun *A. muricata* L dosis tinggi dan amoksisilin dosis rendah memberikan efek sinergistik pada *S. aureus*.

Kata Kunci: Resistensi antibiotik, *Annona muricata* L, Amoksisilin, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

Korespondensi:

Reza Hakim, (034)15978920

Jl. MT Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65145

e-mail: rezahakim@unisma.ac.id

The Antibacterial Effect of Combination *Annona muricata* L Leaf Decoction or Methanol Extract with Amoxicillin on *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* In Vitro

Dhimas Kurniawan, Erna Sulistyowati, Reza Hakim*

*Faculty of Medicine, University of Islam Malang

ABSTRACT

Introduction: Antibiotic resistance is now a global problem. Alternative strategy to prevent antibiotic resistance is using herbs as an antibiotic adjuvant. *Annona muricata* L leaf extract has an antibacterial activity, so it is potential to be antibiotic adjuvants. This research aim to know the interaction of combination between *A. muricata* L leaf extract and Amoxicillin on *S. aureus* and *E. coli*.

Method: Extraction method was used methanolic extraction and decoction. Zone of inhibition was evaluated with Kirby Bauer (*disc*) test, and their interaction were calculated with *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test* (AZDAST). Data were considered significant at $p < 0,05$. The variables were divided into 5 groups: high and low dosage of amoxicillin (HDA and LDA), high dosage of leaf *A. muricata* L methanolic extract (HDHM), high dosage leaf of *A. muricata* L decoction (HDHD), methanolic extract of *A. muricata* and amoxicillin combination (EMAA), and leaf *A. muricata* L decoction-amoxicillin (HDTD) compound in *S. aureus* and *E. coli*.

Results: Zone of inhibition on *S. aureus* from low dosage antibiotic (ADR) and high dosage *A. muricata* L methanolic extract (HDTM, $14,0 \pm 2,1$ mm) were higher in comparison with single ADR ($8,0 \pm 0,0$ mm, $p = 0,037$). In other hand, high dosage *A. muricata* L decoction extract (HDTD, $21,0 \pm 0,6$ mm) were higher in comparison with single ADR ($12,0 \pm 0,8$ mm, $p = 0,045$). There were no significant results on the combination of both decoction and methanolic extract of *A. muricata* L with amoxicillin on *E. coli*

Conclusion: The combination high dosage of both decoction and methanolic extract of *A. muricata* L with low dosage amoxicillin showed synergistic effect on *S. aureus*.

Keywords: Antibiotic resistance, *Annona muricata* L, Amoxicillin, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

Correspondence to:

Reza Hakim, (034)1578920

Jl. MT Haryono 193 Malang City, East Java, Indonesia, 65145

PENDAHULUAN

Penggunaan antibiotik secara tidak tepat dan tanpa indikasi yang jelas menyebabkan resistensi antibiotik terus mengalami peningkatan.¹ Menurut *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* atau EARSS, angka resistensi di Eropa tahun 2002 – 2009 mencapai 71% pada bakteri *Escherichia coli* dan 34% pada bakteri *Staphylococcus aureus*.² Resistensi antibiotik yang semakin tinggi menyebabkan terapi penyembuhan terhadap berbagai infeksi menjadi lebih sulit. Perkiraan penduduk yang akan mengalami resistensi terhadap antibiotik saat ini mencapai angka 10 juta jiwa per tahun.³ *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* merupakan flora normal dalam tubuh manusia yang dapat menimbulkan infeksi sekunder ataupun menjadi patogen apabila jumlahnya meningkat.⁴ Resistensi *Escherichia coli* terhadap amoksisilin di air sungai menunjukkan hasil 80% dan air rumah tangga 66,7% dan terdapat peningkatan resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap amoksisilin menggunakan metode adaptif gradual^{5,6}.

Penanganan bakteri yang resisten membutuhkan herbal yang mengandung zat antimikroba untuk memodulasi antibiotik. Daun *A.muricata* L memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Senyawa ekstrak yang terkandung dalam daun *A.muricata* L antara lain saponin, flavonoid, tanin, alkaloid, terpenoid. Masing-masing senyawa kimia pada daun *A.muricata* L memiliki mekanisme yang berbeda dalam menghambat atau membunuh bakteri. Flavonoid, saponin, terpenoid bekerja sebagai antibakteri dengan cara merusak membran plasma pada bakteri. Tanin dan alkaloid bekerja sebagai antibakteri dengan cara merusak struktur dinding sel pada bakteri.^{7,8} Hal tersebut menjadi dasar pemilihan metode ekstraksi pada penelitian ini, yaitu maserasi dengan pelarut metanolik serta dekoktasi dengan pelarut aquades, dimana kedua pelarut tersebut juga bersifat polar sehingga diharapkan dapat menarik senyawa fitokimia daun *A.muricata* L. Metode maserasi dapat digunakan untuk mengekstrak senyawa yang relatif bersifat polar, nonpolar dan semipolar, sedangkan dekokta mampu mengekstrak senyawa yang tahan terhadap panas.⁹

World Health Organization (WHO) telah membuat rencana aksi global untuk mewujudkan optimalisasi penggunaan antibiotik, salah satunya melalui terapi kombinasi antibiotik dengan herbal yang diharapkan mampu meningkatkan spektrum antibakteri dan menurunkan toksisitas.^{10,11} Beberapa penelitian kombinasi herbal dan antibiotik yang telah dilakukan antara lain daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan amoksisilin, kulit batang kayu manis (*Cinnamomum burmanni*) dengan ampicilin dan daun sirih dengan amoksisilin.^{12,13,14}

Penelitian kombinasi daun *A.muricata* L dengan amoksisilin masih belum dilakukan. *S.aureus* dan *E.coli* merupakan organisme model dalam penelitian ini yang mewakili bakteri Gram positif dan Gram negatif. Perlu

penelitian lebih lanjut mengenai efek kombinasi dari tanaman herbal daun *A.muricata* L dengan antibiotik amoksisilin terhadap bakteri *S.aureus* dan *E.coli* secara *in vitro*. Mengingat tingginya prevalensi serta resistensi bakteri terhadap berbagai antibiotik salah satunya amoksisilin.

METODE PENELITIAN

Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental laboratorium secara *in vitro*. Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Herbal Biomedik dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang pada bulan Maret-Mei 2019.

Pembuatan Ekstrak Metanolik Daun *A.muricata* L

Daun *A.muricata* L didapatkan dari UPT Materia Medica Batu berupa simplisia dalam bentuk serbuk yang, kemudian dilakukan ekstraksi di Laboratorium Herbal Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

Metode maserasi dilakukan dengan tahapan simplisia ditimbang menggunakan neraca digital sebanyak 40 gram dan dicampurkan dengan pelarut methanol 96% sebanyak 400 ml untuk direndam didalam Erlenmeyer. Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil lalu dimasukkan dalam *shaker water bath* dan dibiarkan selama 24 jam. Setelah itu hasil ekstrak disaring dengan *vacuum buchner* dan dievaporasi pada suhu 45°C. Selanjutnya, ekstrak dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C. Bila ekstrak telah kering dilarutkan kembali dengan methanol 96% hingga diperoleh ekstrak cair.^{15,16,17}

Pembuatan Dekokta Daun *A.muricata* L

Daun *A.muricata* L didapatkan dari UPT Materia Medica Batu berupa simplisia dalam bentuk serbuk yang, kemudian dilakukan ekstraksi di Laboratorium Herbal Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

Pembuatan dekokta dengan konsentrasi 10% merupakan rujukan dosis eksplorasi dengan melalui tahapan penimbangan serbuk simplisia herbal menggunakan neraca digital sebanyak 40 gram kemudian diletakkan dalam panci dekokta, lalu tambahkan 400 ml aquadest atau air ke dalam panci tersebut, panaskan selama 30 menit dengan suhu 90°C. Setelah itu, angkat lalu saring dekokta dengan vakum.¹⁸

Pembuatan Larutan Antibiotik

Amoksisilin murni dipersiapkan dan ditimbang dengan neraca digital sebanyak 1 gram. Kemudian, serbuk dilarutkan didalam 10 ml aquades steril sehingga didapatkan konsentrasi 100 mg/ml. Dari larutan 100 mg/ml diambil 1 ml, kemudian ditambahkan aquadest steril hingga didapatkan konsentrasi 10 mg/ml. Dari larutan dengan konsentrasi 10 mg/ml diambil 1 ml dan ditambahkan aquades steril hingga volume menjadi

10ml sehingga didapatkan larutan amoksisilin dengan konsentrasi 1mg/ml.¹⁹

Persiapan dan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

S.aureus dan *E.coli* yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Malang yang diambil dari isolat klinis, selanjutnya dilakukan inokulasi bakteri dalam media *Nutrient Agar* (NA), kemudian diinkubasi selama \pm 18-24 jam pada suhu 37°C¹⁷ Bakteri hasil inokulasi sebelumnya dilarutkan dengan NaCl 0.9% steril dalam tabung reaksi kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks. Selanjutnya larutan diambil menggunakan mikropipet dan dibaca dengan spektrofotometer gelombang 600nm, hasil absorbansi kemudian dilakukan pengenceran sesuai rumus dengan NaCl 0.9% (hasil absorbansi/0.2 \rightarrow total volume pengenceran)¹⁷

Pembuatan Media

Nutrient Agar (NA) dilarutkan dalam aquades steril dengan perbandingan 1:50 kemudian di autoklaf. Setelah steril suhu media diukur menggunakan termometer cahaya, apabila suhu < 50°C suspensi bakteri yang telah dibuat pada tahap sebelumnya dimasukkan sebanyak 1% (5 ml dalam 500 ml media), selanjutnya media digoyangkan hingga suspensi bakteri tercampur rata lalu dituang ke dalam cawan petri (20-25ml).²⁰

Zone of inhibition(ZOI) Bakteri

Uji zona inhibisi diawali dengan melakukan persiapan media yang telah ditambahkan dengan suspensi *S.aureus* dan *E.coli* pada tahap sebelumnya. Kemudian pada tiap media dibuat 10 lubang berdiameter sekitar 6 mm menggunakan *cork borer*²¹ Metode ini menggunakan konsentrasi 100 mg/ml amoksisilin 100 mg/ml ekstrak metanolik daun *A.muricata* L, dan dekokta daun *A.muricata* L konsentrasi 10% (40 gr simplisia dalam 400 ml aquades), serta dilakukan pengenceran sebesar 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 dari konsentrasi awal. Pada tiap lubang sumuran dimasukkan sampel sebanyak 30 μ l untuk uji ZOI tunggal, dan masing-masing 15 μ l pada ZOI kombinasi. Media tersebut dibagi menjadi lima kelompok yakni kelompok pertama adalah larutan amoksisilin tunggal, kelompok kedua yaitu dekokta daun *A.muricata* L tunggal, kelompok ketiga yakni ekstrak metanolik daun *A.muricata* L tunggal, kelompok keempat yang terdiri dari larutan antibiotik dandekokta daun *A.muricata* L, dan kelompok kelima yang terdiri dari larutan antibiotik dan ekstrak metanolik daun *A.muricata* L 10%. Selanjutnya media diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam.

Uji ZOI kombinasi menggunakan dua dosis, yaitu dosis tinggi (+) dan dosis rendah (-). Dosis+ adalah dosis perlakuan tunggal yang menghasilkan diameter ZOI terbesar (dilusi 1), sedangkan dosis- adalah dosis

terendah pada perlakuan tunggal yang menghasilkan diameter ZOI \geq 8 mm (Yunensa, 2018).¹³

Pembacaan interaksi kombinasi Antitbiotik dan Herbal

Evaluasi dilakukan dengan metode AZDAST. Interpretasi dilakukan dengan cara :

Hasil dikatakan sinergis apabila AB > A dan B, Hasil dikatakan potensiasijika A atau B = 0 dan AB > A dan B, Hasil didefinikan aditifketika AB = A dan B, Hasil dikatakan antagonis apabila AB < A dan B, *Not distinguishable* jika AB = A atau B, AB > A dan B.²¹

Keterangan :

A = Herbal

B = Antibiotik

AB = Kombinasi Herbal-Antibiotik

Analisa Data Statistik

Penghitungan hasil ZOI tunggal dan kombinasi menggunakan mistar dengan tingkat ketelitian 1 mm dan data dibuat menggunakan *Microsoft Excel* 2016 untuk mendapat nilai rerata dan standar deviasi. Uji statistik normalitas distribusi data menggunakan *Shapiro Wilk*, karena data terdistribusi tidak normal (p<0,05), maka uji dilanjutkan menggunakan uji non-parametrik *Mann-Whitney*.

HASIL DAN ANALISA DATA

Tabel 1. Hasil Zone of inhibition(ZOI) Amoksisilin Tunggal

Sumuran	Dilusi	Rerata $\bar{x} \pm SD$ (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	1/1	21.3 \pm 1.1	10.8 \pm 0.2
2	1/2	21.6 \pm 2.0	9.5 \pm 1.1
3	1/4	19.7 \pm 0.5	9.0 \pm 0.0
4	1/8	19.7 \pm 2.0	0.0 \pm 0.0
5	1/16	18.0 \pm 1.0	0.0 \pm 0.0
6	1/32	15.7 \pm 1.5	0.0 \pm 0.0
7	1/64	14.3 \pm 1.1	0.0 \pm 0.0
8	1/128	13.0 \pm 5.0	0.0 \pm 0.0
9	1/256	10.0 \pm 2.0	0.0 \pm 0.0
10	1/512	5.6 \pm 5.1	0.0 \pm 0.0
KN		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

Keterangan : >20mm daya hambat sangat kuat, 10-20 daya hambat kuat, 5-10 daya hambat sedang, \leq 5 daya hambat lemah; KN, kontrol negatif berupa pelarut akuades.

3 kali pengulangan hasil ZOI memperlihatkan bahwa pada dilusi yang sama Amoksisilin tunggal menghasilkan diameter ZOI yang lebih besar pada *S.aureus* daripada *E.coli*. Pada dilusi 1/8 Amoksisilin tunggal masih menghasilkan ZOI pada *S.aureus*, sedangkan pada *E.coli* sudah tidak didapatkan ZOI. Hal tersebut menunjukkan bahwa Amoksisilin tunggal lebih efektif menghambat *S.aureus* dibanding *E.coli*. Hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa ZOI amoksisilin tunggal pada *S. aureus* memiliki daya hambat kuat hingga sangat kuat. **Tabel 1.**

Tabel 2. Hasil Zone of inhibition(ZOI) Tunggal Dekokta Daun *A.muricata* L(DA)

Sumuran	Dilusi	Rerata $\bar{x} \pm \bar{SD}$ (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
2	1/2	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
3	1/4	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
4	1/8	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
5	1/16	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
6	1/32	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
7	1/64	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
8	1/128	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
9	1/256	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
10	1/512	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
KN		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

Keterangan: KN, kontrol negatif akuades

Hasil ZOI tunggal dekokta daun *A.muricata* L dapat dilihat pada **Tabel 2**. Menunjukkan bahwa 3 kali pengulangan dekokta daun *A.muricata* L tidak mampu menghambat pertumbuhan *S.aureus*. Hal tersebut juga terjadi pada dekokta daun *A.muricata* L yang tidak mampu menghambat pertumbuhan *E.coli*.Dapat dilihat bahwa DA dalam berbagai dilusi tidak memiliki ZOI terhadap *S.aureus* maupun *E.coli*.

Tabel 3. Hasil Zone of inhibition(ZOI)Ekstrak Metanolik Daun *A.muricata* L(EMA) Tunggal

Sumuran	Dilusi	Rerata $\bar{x} \pm \bar{SD}$ (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
2	1/2	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
3	1/4	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
4	1/8	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
5	1/16	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
6	1/32	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
7	1/64	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
8	1/128	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
9	1/256	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
10	1/512	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
KN		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

Keterangan: KN, kontrol negatif pelarut metanolik

Hasil ZOI ekstrak metanolik daun *A.muricata* L dapat dilihat pada **Tabel 3**. Menunjukkan bahwa 3 kali pengulangan ekstrak metanolik daun *A.muricata* L tidak mampu menghambat pertumbuhan *S.aureus*. Hal tersebut juga terjadi pada ekstrak metanolik daun *A.muricata* L yang tidak mampu menghambat pertumbuhan *E.coli*.Dapat dilihat bahwa EMA dalam berbagai dilusi tidak memiliki ZOI terhadap *S.aureus* maupun *E.coli*.

Tabel 4. Hasil Zone of inhibition(ZOI) Kombinasi Dekokta Daun *A.muricata* L dan Amoksisilin (DAA) pada *S. aureus*

Sumuran	Dosis	Rerata $\bar{x} \pm \bar{SD}$ (mm)
1	HDT+ADT	21.0 \pm 2.3
2	HDT+ADR	21.0 \pm 0,5

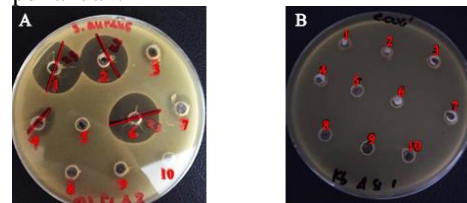
3	-	-
4	ADR	12.0 \pm 0.5
5	-	-
6	ADT	21.0 \pm 1.1
7	-	-
8	HDT	0.0 \pm 0.0
9,10	-	-

Keterangan: Rata-rata ZOI kombinasi dekokta daun *A.muricata* pada bakteri *S. Aureus* ADT, Antibiotik Dosis Tinggi (dilusi 1/1); ADR, Antibiotik Dosis Rendah (dilusi 1/64); HDT, Herbal Dosis Tinggi (dilusi 1/1); Sumuran 3,5,7,9 dan 10 pada *S. Aureus* dikosongkan untuk memberikan jarak antar perlakuan.

Tabel 5. Hasil Zone of inhibition(ZOI) Kombinasi Dekokta Daun *A.muricata* L dan Amoksisilin(DAA) pada *E. coli*

Sumuran	Dosis	Rerata $\bar{x} \pm \bar{SD}$ (mm)
1	HDT+ADT	0.0 \pm 0.0
2	HDT+ADR	0.0 \pm 0.0
3	-	-
4	ADR	0.0 \pm 0.0
5	-	-
6	ADT	0.0 \pm 0.0
7	-	-
8	HDT	0.0 \pm 0.0
9,10	-	-

Keterangan: Rata-rata ZOI kombinasi dekokta daun *A.muricata* pada bakteri *S. aureus*; ADT, Antibiotik Dosis Tinggi (dilusi 1/1); ADR, Antibiotik Dosis Rendah (dilusi 1/4); HDT, Herbal Dosis Tinggi (dilusi 1/1); Sumuran 3,5,7,9 dan 10 pada *S. aureus* dan *E. coli* dikosongkan untuk memberikan jarak antar perlakuan.



Keterangan: Gambar 1. A. ZOI kombinasi dekokta daun *A.muricata* L dengan Amoksisilin terhadap *S. aureus*; B. ZOI kombinasi dekokta daun *A.muricata* L dengan Amoksisilin terhadap *E. Coli*

Tabel 6 Interaksi Kombinasi Dekokta Daun *A.muricata* L dengan Amoksisilin terhadap bakteri *S.aureus* atau *E.coli*

Dosis	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
ADT+HDT	Nd	Nd
ADR+HDT	↑*	Nd

Keterangan: ↑, efek kombinasi meningkat; ↓, efek kombinasi menurun; HDT, Herbal Dosis Tinggi; ADT, Antibiotik Dosis Tinggi; ADR, Antibiotik Dosis Rendah; =, Aditif; Nd, *Not distinguishable*/efek

kombinasi tidak ada perbedaan dari penggunaan tunggalnya; P, Potensiasi; *, signifikan.

Berdasarkan Tabel 4, Tabel 5, Tabel 6 serta Gambar 1 Menunjukkan 3 kali pengulangan uji ZOI Dekokta daun *A. muricata* L dengan Amoksisilin (DAA) pada *S. aureus* bersifat sinergis karena didapatkan peningkatan diameter ZOI, berdasarkan uji statistik *Mann-Whitney Test* didapatkan interaksi dosis yang signifikan ($p < 0.05$) pada kelompok dosis antibiotik dosis rendah dengan herbal dosis tinggi (ADR+HDT). Pada kelompok dosis antibiotik dosis tinggi dengan herbal dosis tinggi (ADT+HDT) pada *S. aureus* bersifat aditif karena tidak didapatkan peningkatan ZOI, berdasarkan uji statistik *Mann-Whitney Test* didapatkan interaksi dosis yang tidak signifikan ($p > 0.05$) dibanding ZOI tunggal kontrolnya. Sedangkan terhadap *E. coli* hasil Uji ZOI bersifat Nd (*Not distinguishable*/efek kombinasi tidak ada perbedaan dari penggunaan tunggalnya) yang tidak terbentuk pada semua dosis uji, berdasarkan uji statistik *Mann-Whitney Test* didapatkan interaksi dosis yang tidak signifikan ($p > 0.05$).

Tabel 7. Hasil Zone of inhibition (ZOI) Kombinasi Ekstrak Metanolik dan Amoksisilin (EMAA) pada *S. aureus*

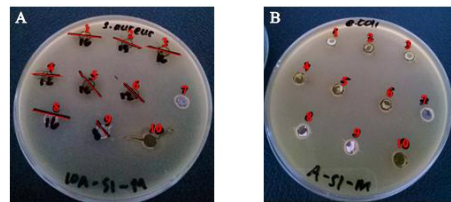
Sumuran	Dosis	Rerata $\bar{x} \pm SD$ (mm)
1;3;5	HDT+ADT	16,0 \pm 0.0
2;4;6	HDT+ADR	14,0 \pm 2.9
7	-	-
8	ADT	16,0 \pm 0.0
9	ADR	8,0 \pm 0.0
10	HDT	0,0 \pm 0.0

Keterangan : Rata-rata ZOI kombinasi Ekstrak metanolik daun *A. muricata* L pada bakteri *S. aureus*; ADT, Antibiotik Dosis Tinggi (dilusi 1/1); ADR, Antibiotik Dosis Rendah (dilusi 1/64); HDT, Herbal Dosis Tinggi (dilusi 1/1) pada *S. Aureus* Sumuran 7 dikosongkan untuk memberikan jarak antar perlakuan.

Tabel 8. Hasil Zone of inhibition (ZOI) kombinasi ekstrak metanolik dan Amoksisilin (EMAA) pada *E. coli*

Sumuran	Dosis	Rerata $\bar{x} \pm SD$ (mm)
1;3;5	HDT+ADT	0.0 \pm 0.0
2;4;6	HDT+ADR	0.0 \pm 0.0
7	-	-
8	ADT	0.0 \pm 0.0
9	ADR	0.0 \pm 0.0
10	HDT	0.0 \pm 0.0

Keterangan : Rata-rata ZOI kombinasi Ekstrak metanolik daun *A. muricata* L pada bakteri *E. coli*; ADT, Antibiotik Dosis Tinggi (dilusi 1/1); ADR, Antibiotik Dosis Rendah (dilusi 1/4); HDT, Herbal Dosis Tinggi (dilusi 1/1) pada *E. coli* Sumuran 7 dikosongkan untuk memberikan jarak antar perlakuan.



Keterangan: Gambar 2. A. ZOI Kombinasi ekstrak metanolik daun *A. muricata* L dengan Amoksisilin terhadap *S. aureus*; B. ZOI Kombinasi ekstrak metanolik daun *A. muricata* L dengan Amoksisilin terhadap *E. coli*

Tabel 9. Interaksi Kombinasi Ekstrak Metanolik Daun *A. muricata* L dengan Amoksisilin terhadap bakteri *S. aureus* atau *E. coli*

Dosis	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
ADT+HDT	Nd	Nd
ADR+HDT	↑*	Nd

Keterangan: ↑, efek kombinasi meningkat; ↓, efek kombinasi menurun; HDT, Herbal Dosis Tinggi; ADT, Antibiotik Dosis Tinggi; ADR, Antibiotik Dosis Rendah; =, Aditif; Nd, *Not distinguishable*/efek kombinasi tidak ada perbedaan dari penggunaan tunggalnya; P, Potensiasi; *, signifikan.

Berdasarkan Tabel 7, Tabel 8, dan Tabel 9, serta Gambar 2 Menunjukkan 3 kali pengulangan uji ZOI Ekstrak metanolik daun *A. muricata* L dengan Amoksisilin (EMAA) pada *S. aureus* bersifat sinergis karena didapatkan peningkatan diameter ZOI, berdasarkan uji statistik *Mann-Whitney Test* didapatkan interaksi dosis yang signifikan ($p < 0.05$) pada kelompok dosis antibiotik dosis rendah dengan herbal dosis tinggi (ADR+HDT). Pada kelompok dosis antibiotik dosis tinggi dengan herbal dosis tinggi (ADT+HDT) pada *S. aureus* bersifat aditif karena tidak didapatkan peningkatan ZOI, berdasarkan uji statistik *Mann-Whitney Test* didapatkan interaksi dosis yang tidak signifikan ($p > 0.05$) dibanding ZOI tunggal kontrolnya. Sedangkan terhadap *E. coli* hasil Uji ZOI bersifat Nd (*Not distinguishable*/efek kombinasi tidak ada perbedaan dari penggunaan tunggalnya) yang tidak terbentuk pada semua dosis uji, berdasarkan uji statistik *Mann-Whitney Test* didapatkan interaksi dosis yang tidak signifikan ($p > 0.05$).

PEMBAHASAN

Zone of inhibition (ZOI) Amoksisilin Tunggal

ZOI amoksisilin lebih sensitif terhadap *S. aureus* dibandingkan *E. coli*. Hasil tersebut dikarenakan perbedaan struktur bakteri dan mekanisme dari antibiotik pada *S. aureus* dan *E. coli*. Struktur dinding sel bakteri Gram positif relatif sederhana yang terdiri atas tiga lapis yaitu selaput sitoplasmik, lapisan peptidoglikan dan lapisan luar yang disebut simpai. Sebaliknya, bakteri Gram negatif mempunyai struktur yang berlapis-lapis dan sangat kompleks.¹⁹ Struktur dinding sel bakteri Gram positif yang relatif sederhana tersebutlah yang menyebabkan antibiotik lebih mudah

masuk ke dalam sel dan menemukan sasaran untuk bekerja. Hal ini berbeda dengan bakteri Gram negatif, dimana antibiotik harus melewati struktur dinding sel yang relatif kompleks.²¹

Mekanisme kerja Amoksisilin yang merupakan golongan β -laktam, dapat berikatan dengan PBP (*penicillin binding protein*), ikatan tersebut dapat menghambat reaksi transpeptidasi dan sintesis peptidoglikan sehingga dinding sel bakteri tidak terbentuk dan mengalami lisis. Lapisan pada gram negatif lebih kompleks, menyebabkan *E. coli* menjadi susah ditembus oleh Amoksisilin.²¹ Kerja antibiotik pada bakteri Gram negatif seperti *E. coli*, dapat menembus membran terluar selubung bakteri secara difusi pasif melalui saluran yang terbentuk oleh pori protein. Setelah menembus membran terluar, antibiotik masuk melalui dinding sel melewati ruang periplasma dan mencapai sasaran, yaitu enzim serin protease yang terdapat pada membran terdalam (sitoplasma). Enzim inilah yang bertanggung jawab terhadap biosintesis dinding sel.²² Lapisan lipopolisakarida yang dimiliki bakteri Gram negatif dapat berfungsi mencegah kerusakan sel terhadap enzim dan bahan kimia yang dapat merusak sel. Lisozim dapat merusak bakteri Gram positif, sedangkan pada bakteri Gram negatif lapisan membran luar yang dimilikinya mencegah kerusakan sel bakteri, oleh karena enzim tersebut tidak dapat menembus lapisan membran luar.¹⁹

Faktor bias pada penelitian ini pada pengenceran akhir tidak menggunakan dapar, dimana dapar adalah buffer pH pada amoksisilin yang menjaga efektivitas dan stabilitas dari amoksisilin yang bekerja maksimal pada pH 3,5-6. Pemilihan pH dianggap penting karena dapat mempengaruhi kelarutan dan laju disolusi obat atau kecepatan efek yang diberikan obat terhadap target sehingga dapat mempengaruhi hasil uji ZOI tunggal maupun kombinasi.²³

Zone of inhibition(ZOI) Ekstrak Metanolik daun *Annona muricata* L(EMA) Tunggal

Hasil penelitian sebetulnya menunjukkan adanya ZOI yang terbentuk dari ekstrak metanol daun muda sirsak *A. muricata* L dengan konsentrasi dan diameter 5% (12,5mm), 10% (14mm), 15% (15mm), 20% (16,5mm) dan 25% (18mm) terhadap bakteri *S. aureus* yang diinkubasi selama 24jam.²⁴ Penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa pada konsentrasi ekstrak *A. muricata* L 100% (25mm), 90% (24,5mm), 80% (18,5mm), 70% (16,5 mm), 60% (14,5mm), 50% (14mm), 40% (11mm), 30% (8mm), dan 20% (6mm) terbentuk zona jernih, yang berarti pada konsentrasi tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.²⁵ Pada penelitian ini EMA tidak mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* maupun *E. coli*. Hal tersebut terdapat beberapa faktor yang tidak dapat dikontrol yang mempengaruhi hasil dari penelitian ini seperti jenis bakteri, lingkungan tempat tanaman berasal, dan efektivitas ekstrak.

Daun *A. muricata* Lyang digunakan dalam penelitian sebelumnya berasal dari desa Kasia Kabupaten Gorontalo Utara, dimana ekstrak *A. muricata* L menunjukkan daya hambat pada konsentrasi 25%, terhadap bakteri *S. aureus* dengan adanya ZOI yang terbentuk pada media uji.²⁶ Hal tersebut menggambarkan faktor tanaman berasal untuk pembandingan tanaman herbal yang digunakan dalam penelitian ini.

Zone of inhibition(ZOI) Dekokta daun *Annona muricata* L(DA) Tunggal

ZOI DA terhadap *S. aureus* dan *E. coli* tidak mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* maupun *E. coli*. Senyawa Flavonoid, saponin serta beberapa senyawa alkaloid memiliki sifat tidak tahan terhadap panas.²⁷ Suhu tinggi dan waktu ekstraksi yang lama dapat menyebabkan epimerisasi, oksidasi dan degradasi senyawa aktif daun *A. muricata* L.²⁸ Waktu inkubasi juga mempengaruhi daya hambat dekokta, sesuai hasil penelitian sebelumnya yang menyimpulkan bahwa semakin lama waktu inkubasi maka semakin menurunkan aktivitas dekokta dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Tidak munculnya daya hambat Dekokta daun *A. muricata* L terhadap *S. aureus* dan *E. coli* juga dapat disebabkan karena rendahnya konsentrasi bahan coba dimana pada penelitian ini hanya digunakan dekokta daun *A. muricata* L 10%.²⁹ Selain itu, meskipun air memiliki tingkat kepolaran yang tinggi, namun penggunaannya sebagai pelarut ekstraksi jarang dilakukan karena mempunyai beberapa kelemahan seperti menyebabkan reaksi fermentatif (mengakibatkan kerusakan bahan aktif lebih cepat), pembengkakan sel serta mudah terkontaminasi jamur maupun bakteri, sehingga dapat menurunkan efektivitas kinerja zat aktif herbal.³⁰

Terdapat berbagai faktor yang dapat mempengaruhi luasnya ZOI dekokta daun *A. muricata* L. Faktor simplisia diduga dapat berpengaruh terhadap hasil zona hambat yang ditimbulkan. Proses pembuatan simplisia harus sesuai dengan kriteria standarisasi pembuatan simplisia meliputi pengumpulan bahan baku, sortasi basah (pemilihan hasil panen saat tanaman masih segar), pencucian, pengubahan bentuk, pengeringan, sortasi kering, pengepakan dan penyimpanan. Beberapa faktor diatas bisa mempengaruhi hasil yang didapatkan dalam penelitian ini.³¹

Zone of inhibition(ZOI) Kombinasi Ekstrak Metanolik daun *Annona muricata* L dengan Amoksisilin(EMAA) dan Dekokta daun *Annona muricata* L dengan Amoksisilin(DAA) pada *Staphylococcus aureus*

ZOI kombinasi EMAA pada kelompok dosis HDT+ADR dan ZOI kombinasi DAA pada kelompok

dosis HDT+ADR pada *S.aureus* bersifat sinergis. Sifat sinergis kombinasi EMAA dan sifat sinergis DAA pada *S.aureus* dapat disebabkan karena adanya interaksi yang saling menguatkan antara amoksisilin dengan ekstrak metanolik maupun dekokta daun *A.muricata* L sehingga menyebabkan peningkatan daya hambat bakteri yang signifikan. Pada penelitian ini tidak didapatkan zoi tunggal dan kombinasi kontrol pada ekstrak metanolik dan dekokta daun *A.muricata* L. Sedangkan saat dikombinasikan dengan amoksisilin didapatkan adanya hasil yang sinergis. Hal ini disebabkan karena adanya sifat zat yang satu meningkatkan kerja zat yang lain. Apabila dua obat atau lebih diberikan bersamaan, maka yang satu dapat menjadi interaktan dari yang lainnya. Ini dapat menyebabkan kerja obat berubah, terjadi sinergisme, potensiasi, aditif, antagonisme, atau kerja obat berkurang/terhambat.³² Hal diatas bisa menunjang pengobatan amoksisilin dengan kombinasi *A.muricata* L menggunakan dosis rendah yang memiliki keefektifan yang sama dengan penggunaan amoksisilin dosis tingginya pada *S.aureus*. Penggunaan tanaman herbal tidak dapat menjadi terapi utama melainkan sebagai terapi tambahan dalam mengatasi suatu penyakit karena aktivitas kerja herbal yang lama dan tidak spesifik, melainkan yang diharapkan dapat meningkatkan efek dari antibiotik dan memperkecil angka resistensi.³³

Efek sinergistik kombinasi dosis rendah amoksisilin dengan daun *A.muricata* L pada penelitian ini dikuatkan oleh penelitian sebelumnya juga menyatakan bahwa kombinasi herbal yang memiliki aktivitas antibakteri dapat bersifat sinergis bila dikombinasi dengan antibiotik konsentrasi rendah sehingga dapat menjadi pendekatan untuk mengurangi dosis efektif antibiotik, dan mengurangi efek samping antibiotik.³⁴ Senyawa yang terkandung dalam daun *A.muricata* L antara lain saponin, flavonoid, tanin, alkaloid, terpenoid. Masing-masing senyawa kimia pada daun *A.muricata* L memiliki mekanisme yang berbeda dalam menghambat atau membunuh bakteri. Flavonoid, saponin, terpenoid bekerja sebagai antibakteri dengan cara merusak membran plasma pada bakteri. Tanin dan alkaloid bekerja sebagai antibakteri dengan cara merusak struktur dinding sel pada bakteri sehingga mempermudah amoksisilin untuk bekerja merusak dinding sel bakteri.^{7,8} Efek sinergistik dapat ditimbulkan oleh adanya *efflux pump inhibitor* (EPI) dari senyawa aktif tanaman yang merupakan mekanisme resistensi bakteri. EPI bekerja dengan menghambat *efflux pump* sehingga menyebabkan peningkatan konsentrasi antibiotik di dalam sel bakteri. Konsentrasi amoksisilin akan meningkat ketika terjadi hambatan *efflux pump* oleh senyawa tanin daun *A.muricata* L sehingga dapat meningkatkan aktivitas antibakteri amoksisilin.³⁵

ZOI kombinasi EMAA pada kelompok dosis HDT+ADT dan ZOI kombinasi DAA pada kelompok dosis HDT+ADT pada *S.aureus* bersifat aditif. Sifat aditif kombinasi EMAA dan sifat aditif DAA pada

S.aureus. Apabila dua obat atau lebih diberikan bersamaan, maka yang satu dapat menjadi interaktan dari yang lainnya. Ini dapat menyebabkan kerja obat berubah, terjadi sinergisme, potensiasi, aditif, antagonisme, atau kerja obat berkurang/terhambat. Penelitian sebelumnya menyatakan pada dosis tinggi antibiotik bakteri akan terbunuh lebih cepat apabila konsentrasi zat antibakteri lebih tinggi, sedangkan aktivitas kerja herbal lama dan tidak spesifik ini.^{33,36}

Zone of inhibition (ZOI) Kombinasi Ekstrak Metanolik daun *Annona muricata* L dengan Amoksisilin (EMAA) dan Dekokta daun *Annona muricata* L dengan Amoksisilin (DAA) pada *Escherichia coli*.

Kombinasi EMAA dan DAA terhadap *E.coli* bersifat Nd (*Not distinguishable*) pada semua kelomok dosis, karena efek kombinasi tidak ada perbedaan dari penggunaannya tunggalnya dilihat pada diameter ZOI yang tidak terbentuk. Sifat Nd (*Not distinguishable*) tersebut dapat terjadi karena tidak adanya interaksi yang saling menguatkan atau mengganggu antara amoksisilin dengan ekstrak metanolik maupun dekokta daun *A.muricata* L. Ketahanan suatu bakteri terhadap senyawa antibakteri berkaitan erat dengan struktur dinding selnya. yang menyatakan bahwa senyawa aktif yang berasal dari tanaman sering menunjukkan aktivitas yang lebih baik terhadap bakteri gram positif tetapi tidak terhadap bakteri gram negatif.³⁶ Bakteri gram negatif memiliki barrier permeabilitas yang efektif. Adanya barrier permeabilitas inilah yang kemungkinan besar menyebabkan aktivitas antibakteri dari senyawa aktif ekstrak metanol maupun dekokta daun *A.muricata* L menjadi tidak efektif.³⁶ Daun *A.muricata* L mengandung banyak senyawa metabolit primer maupun sekunder, beberapa diantaranya tidak berpotensi sebagai antibakteri. Sehingga, diduga bahwa keberagaman kandungan daun *A.muricata* L tersebut menyebabkan amoksisilin menjadi kurang efektif atau lebih sulit bekerja pada *E.coli*.³³

Faktor penyebab bias berikutnya adalah bakteri *E.coli* yang digunakan juga dapat mempengaruhi hasil penelitian²⁵. Pada penelitian sebelumnya melaporkan bahwa terdapat perbedaan sensitivitas amoksisilin pada strain *E.coli* terstandarisasi (*American Type Culture Collection/ ATCC*) dengan strain *E.coli* lokal. Hal itu terjadi karena *E.coli* ATCC dikultur ulang tanpa pengaruh lingkungan yang berarti, sedangkan strain *E.coli* lokal/ isolat klinis sebagaimana yang digunakan pada penelitian ini telah banyak mendapat pengaruh dari lingkungan yang dinamis sehingga timbul mekanisme pertahanan diri dengan mutasi gen yang mengakibatkan resistensi terhadap pemberian amoksisilin³⁷. Mekanisme pertahanan diri bakteri terhadap pemberian amoksisilin dapat disebabkan oleh empat mekanisme yaitu : (1) β -laktamase yang menginaktivasi antibiotik, (2) modifikasi dari PBP, (3) obat mengalami gangguan penetrasi pada PBP dan (4) eflluks. Dari keempat mekanisme resistensi

Amoksisilin, mekanisme yang sering terjadi adalah β -laktamase yang menginaktivasi antibiotik. Enzim ini sebagian besar dapat dihasilkan oleh *S. aureus*, *H. influenza*, dan *E. Coli*³⁸, oleh karena mekanisme pertahanan diri oleh bakteri inilah yang kemungkinan besar menyebabkan aktivitas antibakteri dari senyawa aktif ekstrak metanol maupun dekokta daun *A.muricata* menjadi tidak efektif. Daun *A.muricata* mengandung banyak senyawa metabolit primer maupun sekunder, beberapa diantaranya tidak berpotensi sebagai antibakteri. Sehingga, diduga bahwa keberagaman kandungan daun *A.muricata* tersebut menyebabkan amoksisilin menjadi kurang efektif atau lebih sulit bekerja pada *E.coli* maupun *S. aureus*.³⁹

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisa data dan pembahasan penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Kombinasi ekstrak metanolik daun *A.muricata* L dengan amoksisilin dapat meningkatkan daya hambat terhadap bakteri *S.aureus*.
2. Kombinasi dekokta daun *A.muricata* L dengan amoksisilin dapat meningkatkan daya hambat terhadap bakteri *S.aureus*.
3. Kombinasi ekstrak metanolik daun *A.muricata* L dengan amoksisilin tidak dapat meningkatkan daya hambat terhadap bakteri *E.coli*.
4. Kombinasi dekokta daun *A.muricata* L dengan amoksisilin tidak dapat meningkatkan daya hambat terhadap bakteri *E.coli*.

SARAN

Adapun beberapa saran untuk meningkatkan penelitian ini di masa mendatang antara lain :

1. Melakukan penelitian lanjutan uji fitokimia untuk mengetahui perbedaan jenis dan kadar senyawa antibakteri pada ekstrak metanolik dan dekokta daun *A.muricata* L.
2. Melakukan penelitian serupa dengan menghilangkan faktor bias antara lain :
 - Membuat larutan amoksisilin menggunakan pelarut yang sesuai dan dilarutkan terakhir menggunakan dampar.
 - Menggunakan strain bakteri yang terstandarisasi, yang dikultur dengan teknik yang tepat.
3. Melakukan penelitian lanjutan fraksinasi senyawa aktif daun *A.muricata* L. Dilanjutkan identifikasi interaksi yang dihasilkan serta efektivitasnya dalam menghambat pertumbuhan *S.aureus* dan *E.coli* ketika dikombinasikan dengan antibiotik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Ikatan Orang Tua Mahasiswa (IOM) selaku pemberi dana pada penelitian ini dan kepada Rio

Risandiyansyah, S.Ked.,MP.,Ph.D selaku reviewer jurnal.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization (WHO). Worldwide Situation Analysis Response to Antimicrobial Resistance. USA: World Health Organization. 2015.
2. Gagliotti, C., Balode, A., Baquero, F., Degener, J., Grundmann, H., Gür, D., Jarlier, V., Kahlmeter, G., Monen, J. and Monnet, D. L. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* 2009. : bad news and good news from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net , formerly EARSS, 2002 to 2009'. 1–5.
3. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia 'Peningkatan Pelayanan Kefarmasian dalam Pengendalian Resistensi Antimikroba 'Apoteker Ikut Atasi Masalah Resistensi Antimikroba'. 2018
4. Waluyo, L., Mikrobiologi Umum. UMM Press, Malang. 2012.
5. Sasongko, H. Uji Resistensi Bakteri *Escherichia Coli* dari Sungai Boyong Kabupaten Sleman terhadap Antibiotik Amoksisilin, Kloramfenikol, Sulfametoksazol, dan Streptomisin. *Jurnal Bioedukatika*. 2014.2 : p. 25-29.
6. Setiawati, A. Peningkatan Resistensi Kultur Bakteri *Staphylococcus aureus* terhadap Amoxicillin Menggunakan Metode Adaptif Gradual. *Jurnal Farmasi Indonesia*. 2015.7 : p. 190-194
7. Juliantina, F., Citra, D.A., Nirwani, B., Nurmasitoh, T., Bowo, E.T. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Agen Antibakterial terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia* 1(1): 12-20. 2009.
8. Mayanti, T; Julaha, E; Putri, Y;. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri dari Fraksi Etil Asetat Kulit Batang *Lansium Domesticum* Corr. Cv Kokossan, Universitas Padjajaran, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Bandung, (Naskah Publikasi). 2011.
9. Meloan, CE. Chemical Separation Principles Techniques and Experiments Techniques in Analytical Chemistry. New York : J. Willey. 1999.
10. Aiyegoro, O., Adwust, A., Oyedem, S., Akinpelu, D.& Okoh, A. Interactions of Antibiotics and Methanolic Crude Extract of *Afzelia Africana*(Smith) Against Drug Resistance Bacterial Isolates. *International Journal of Molecular Sciences*. 12:4477-4487. 2011.

11. Sally S. Introductory Clinical Pharmacology. 7th Edition. USA : Lippincott Williams & Wilkins. 2010.
12. Ainiah, Nur. Efek Ekstrak Teh Hijau (*Camellia sinensis* L.) dalam Memodulasi Aktivitas Amoksisilin terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Makassar: Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. 2018
13. Yunensa, Khorina Sari. Pengaruh Kombinasi Antibiotik Ampisilin dan Minyak Atsiri Kulit Batang Kayu Manis (*Cinnamomum burmanni*) terhadap *Staphylococcus aureus*. 2018
14. Fitriana, Gusti Ayu Vivin. Uji Efek Kombinasi Antibiotik Amoksisilin dengan Ekstrak Metanol Daun Sirih (*Piper betle* L.) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma. 2018
15. Irwanto. Ekstraksi Menggunakan Proses Infudasi, Maserasi dan Perkolasi. Jakarta. 2010.
16. Meloan, CE. Chemical Separation. New York : J. Willey, 1999.
17. Kusumaningrum, A., P. Widyaningrum, I. Mubarak. Penurunan Total Bakteri Daging Ayam dengan Perlakuan Perendaman Infusa Daun Salam (*Syzygium polyanthum*). *Jurnal MIPA*. Universitas Negeri Semarang. 36: 14-19. 2013.
18. Pratiwi, ST. Mikrobiologi Farmasi. Jakarta: Penerbit Airlangga. Hlm. 22-42, 154-67, dan 188-89. 2008.
19. Risandiyansyah, Rio. Induction of Secondary Metabolism Across Actinobacterial Genera (Thesis). South Australia: Flinders University. 2016.
20. Hidana, R., Hayati, M. A. F. Daya Hambat Ekstrak Daun Sirsak Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*, *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*, 11, 156-160. 2014.
21. Harvey R.A., Champe P.C. 2009. Pharmacology. 4nd ed. China: Lippincott William & Wilkins. p.249-60. 2009.
22. Siswandono dan Soekardjo, B. Kimia Medisinal. Airlangga University Press, Surabaya. 28-29, 157. 1995.
23. Dirjen POM. Farmakope Indonesia Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. 1995.
24. Hanifa, N. I. Efek Sitoprotektif dan Antioksidan dari Ekstrak Etanolik Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) dan Wortel (*Daucus carota* L.). Tesis. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. 2015.
25. Hidana, R., Hayati, M. A. F. Daya Hambat Ekstrak Daun Sirsak Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*, *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*, 11, 156-160. 2014.
26. Pomalingo, SM. Uji Daya Hambat Ekstrak Metanol Daun Sirsak (*Annona muricata*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. Other thesis, Universitas Negeri Gorontalo. 2014.
27. Kiswandono, Agung Abadi. Skrining Senyawa Kimia dan Pengaruh Metode Maserasi dan Refluks pada Biji Kelor (*Moringa oleifera*, Lamk) terhadap Rendemen Ekstrak yang dihasilkan. Universitas Prima Indonesia (UNPRI), Medan. 2011.
- 28.. Perva-Uzunalić, A., Škerget, M., Knez, Ž., Weinreich B., Otto, F., Grüner Sabine. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry, Elsevier*. 96:597-605. 2006.29. Gunawan, D. dan Mulyani, S. Ilmu Obat Alam (Farmakognosi) Jilid 1. Penebar Swadaya. Jakarta. 2010.
- 29.. Pratama, M.A.M., Airlangga, H., Arfarita Novi. Aktivitas Hambatan Dekokta Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap Bakteri Oportunistik Penyebab Diare: *Escherichia coli* dan *Salmonella spp* secara in vitro. *Jurnal Bio Complementer Medicine*. 3(1). 2016.
30. Hardiningtyas, S.D. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Karang Lunak *Sarcophyton sp* yang difragmentasi dan Tidak difragmentasi di Perairan Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu Bogor. Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB. 2009.
31. Gunawan, D. dan Mulyani, S. Ilmu Obat Alam (Farmakognosi) Jilid 1. Penebar Swadaya. Jakarta. 2010.
32. Joenoes, Nanizar Z. ARS Prescibendi Resep yang Rasional jilid 3. Surabaya; Airlangga University Press. 1994
33. Ciuman, Raphael Richard. Phytotherapeutic and Naturopathic Adjuvant Therapies in Otorhinolaryngology. Eur Arch Otorhinolaryngol. 269:389-397. 2012.
34. Stefanović O. Čomić LJ, Stanojević D, Solujić-Sukdolac S. Antibacterial activity of *Aegopodium podagraria* L. extracts and interaction between extracts and antibiotics. *Turkish Journal of Biology*. 33: p.145-150. 2009.

35. Li, X-Z. & Nikaido, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update, *Drugs*. 1555–1623. 2009
36. Hasan T, Patong R, Wahab AW, Djide MN. Isolasi dan Implementasi Protein Biaktif Kepah (*Atactodea striata*) sebagai Bahan Obat Antibakteri. *Journal UIN- Alauddin*. 47-57. 2014.
37. Krisnaningsih MMF, Asmara W, Wibowo MH. Uji sensitivitas isolat *Escherichia coli* patogen pada ayam terhadap beberapa jenis antibiotik. *Jurnal Sain Veteriner*. 2005. 23(1):13-18.
38. Katzung, Bertram G. *Farmakologi Dasar dan Klinik*, Ed. 12, Vol.2. Jakarta : EGC. 2012
39. Thakur P, Chawla R, Goel R, Narula A, Arora R, Sharma RK. Augmenting the potency of third-line antibiotics with *Berberis aristata*: *In vitro* synergistic activity against carbapenem- resistant *Escherichia coli*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2016. 6: p. 10-16.